

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**O papel do inflamassoma na infecção induzida pelo *Cryptococcus*
*neoformans***

Pedro Henrique Viana Saavedra

Brasília

2013

PEDRO HENRIQUE VIANA SAAVEDRA

**O papel do inflamassoma na infecção induzida pelo *Cryptococcus
neoformans***

**Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Patologia
Molecular, da Faculdade de Medicina
da Universidade de Brasília, como
parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Título de Mestre em
Patologia Molecular.**

Orientador: Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Co-orientador: Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília

2013

Agradecimentos

À minha mãe, vó e tia pelo amor e educação, e por sempre terem me apoiado em todas as minhas decisões acadêmicas e profissionais.

Às minhas orientadoras, Anamélia Lorenzetti Bocca e Kelly Grace Magalhães, pelas oportunidades proporcionadas durante todos esses anos de trabalho como aluno de iniciação científica e de mestrado, e pela confiança depositada em mim.

À minha grande amiga, Nathalia Moraes de Vasconcelos, pois sem ela eu não teria entrado no laboratório e, certamente, não estaria compartilhando esse momento tão importante da minha vida com todos.

Aos meus grandes amigos de semestre e laboratório, pois, certamente sem eles, os dias de trabalho e estudos durante a graduação não seriam tão felizes: Nathalia Vilela, Isadora Freitas, Diogo Magnabosco, Fernanda Guilhelfeli e Rafaela Fontenele.

Aos antigos amigos de laboratório com quem tive a oportunidade de trabalhar e aprender junto com todos. Fabíola Severiano, Tássia Milena, Márcio Jerônimo, Isaque Medeiros e André Amaral. Em especial Ana Camila Oliveira Souza, que me conduziu desde o começo no laboratório para que eu me tornasse uma pessoa independente.

A todos os integrantes do Lab3 (BioMol) e LIPH pelos momentos divertidos e de conversas na copa, e a professora Ildinete Silva-Pereira.

Aos Doutores Dario Simões Zamboni por contribuir com os animais *knockouts* utilizados nesse estudo e Arturo Casadevall por abrir as portas de seu laboratório.

Ao professor Aldo Henrique Tavares, pelas discussões relevantes acerca do trabalho.

Aos amigos de laboratório, que possibilitaram um ambiente de trabalho mais descontraído: Raffael Castro, Yasmin Lima, Manuella Capparelli, Juliana Carvalho, Luiza Leonhardt, Rafael Correa, Raquel Almeida, Cecília Farinasso, Thaís Amanda, Karina Simon.

Aos professores que compõem a banca, por terem disponibilizado o tempo para avaliar este trabalho.

À Universidade de Brasília, que é a minha segunda casa desde 2007. E por onde obtive grande parte dos meus conhecimentos.

Ao CNPq e FAPDF pelo apoio financeiro.

Sumário

Agradecimentos	3
Sumário	5
Índice de figuras	8
Abreviaturas	10
Resumo	13
Abstract.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Infecções fúngicas	15
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
1.3 Cápsula e mecanismos de evasão	18
1.4 Imunidade antifúngica	22
1.5 NLRs e inflamassomas	23
1.6 Inflamassomas não-canônicos	25
1.7 Justificativa	26
1.8 Objetivos	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Animais.....	28
2.2 Cultura celular	28
2.3 Fungos.....	30
2.4 Infecção <i>in vitro</i>	30
2.5 Ensaio de fagocitose e morte.....	31

2.6 Detecção de caspase-1 ativa.....	32
2.7 Western blot.....	33
2.8 Dosagem de citocinas.....	34
2.9 Análise estatística	34
3. RESULTADOS	35
3.1 <i>C. neoformans</i> induz a secreção de IL-1 β em células primadas (?) com LPS	35
3.2 A viabilidade de <i>C. neoformans</i> é necessária para a indução da secreção de IL-1 β	37
3.3 <i>C. neoformans</i> encapsulado e acapsular induzem secreção diferencial de IL-1 β	38
3.4 A ativação de caspase-1 ocorre apenas na ausência da cápsula .	40
3.5 <i>C. neoformans</i> ativa o inflamassoma NLRP3	42
3.6 Mecanismos que levam à ativação de NLRP3 na infecção por <i>C.</i> <i>neoformans</i>	44
3.7 O papel do inflamassoma na fagocitose de leveduras de <i>C.</i> <i>neoformans</i>	46
3.8 O papel do inflamassoma no controle da infecção induzida por <i>C.</i> <i>neoformans</i>	47
3.9 O papel da sinalização da citocina IL-1 β na restrição de leveduras internalizadas.....	50
3.10 O papel de IL-1 β na restrição de leveduras extracelulares	51
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÕES	61

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
--	-----------

Índice de figuras

Figura 1. <i>C. neoformans</i> induz a secreção de IL-1 β em células primadas	36
Figura 2. A viabilidade de <i>C. neoformans</i> é necessária para a indução da secreção de IL-1 β	39
Figura 3. Presença da cápsula de <i>C. neoformans</i> interfere na secreção de IL-1 β	39
Figura 4. A ativação de caspase-1 ocorre apenas na ausência da cápsula	41
Figura 5. <i>C. neoformans</i> ativa o inflamassoma NLRP3.....	43
Figura 6. A ativação do inflamassoma depende do dano lisossomal e sinalização via Syk quinase.....	45
Figura 7. A fagocitose de leveduras ocorre normalmente na ausência do inflamassoma.....	47
Figura 8. Componentes do inflamassoma como ASC, caspase-1 e NLRC4 não participam do controle da infecção.....	49

Figura 9. A sinalização por IL-1 β não contribui para o controle da infecção	
.....	51

Figura 10. IL-1 β limita a taxa de infecção em BMM.....	52
--	----

Figura 11. Modelo proposto da ativação do inflamassoma por <i>C. neoformans</i>	
.....	62

Abreviaturas

°C - Graus Celsius

ATP - Adenosina trifosfato

BMM - Macrófago derivado de medula óssea

CARD - Domínio de recrutamento de caspase

CCR - Receptor de quimiocina

CD - Cluster de diferenciação

CFU - Unidades Formadoras de Colônia

CLR - Receptor do tipo lectina C

CO₂ - Dióxido de carbono

CXCL - Ligante de quimiocina do domínio C-X-C

DNA - Ácido Dexorribonucléico

ELISA - Ensaio de Ligação Imunoenzimática

FLICA - Inibidor fluorescente de caspases

g - Grama

GalXM - Galactoxilomanana

GXM - Glucuronoxilomanana

h – Hora

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfônico

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IFN - Interferon

IL - Interleucina

IL-1 β - Interleucina-1 β

LCCM - Meio condicionado da célula L929

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MOI - Multiplicidade de infecção

NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappaB

NLR - Receptores do tipo NOD

NLRC - Receptor do tipo NOD que contém domínio CARD

NLRP - Receptor do tipo NOD que contém domínio pirina

NOD - Domínio de oligomerização de nucleotídeos

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão Salina Fosfato

pg - Picograma

pH - Potencial hidrogeniônico

PLCγ2 - Fosfolipase C gama

PM - Macrófago peritoneal

PRR - Receptores de reconhecimento de padrão

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RIG - Gene induzível por ácido retinóico

RIPA - Tampão de radioimunoprecipitação

RNA – Ácido Ribonucléico

ROS - Espécie reativa de oxigênio

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SBF - Soro Bovino Fetal

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese de gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

TBS - Solução tampão Tris

Th - Linfócitos T auxiliares

THP-1 - Linhagem celular de monócito humano

TLR - Receptor do tipo Toll

TNF - Fator de Necrose Tumoral

WT - Tipo selvagem

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

Resumo

Cryptococcus neoformans é um fungo encapsulado patogênico humano que afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos. Sua cápsula é um dos mais importantes fatores de virulência, e está envolvida com os processos de evasão da resposta imune e disseminação no hospedeiro. Neste trabalho foi investigado a ativação do inflamassoma por *C. neoformans* e o papel de sua cápsula nesse processo. Observou-se que o mutante acapsular de *C. neoformans* induziu elevados níveis da secreção de IL-1 β e ativação da protease caspase-1. A secreção de IL-1 β foi analisada em macrófagos derivados de medula deficientes para as proteínas ASC, caspase-1, NLRP3 e NLRC4, demonstrando que essa secreção depende do inflamassoma NLRP3, mas não de NLRC4. Além disso, os componentes do inflamassoma se mostraram dispensáveis para fagocitose e atividade antifúngica frente a infecção. Os mecanismos envolvidos no processamento de IL-1 β foram dependentes de catepsina B frente ao dano lisossomal e sinalização via quinase Syk. Foi demonstrado também que a sinalização por IL-1 β não aumenta a atividade antifúngica de macrófagos. No entanto, ela participa na restrição da taxa de infecção por mecanismos desconhecidos. Estes resultados mostram pela primeira vez que *C. neoformans* ativa o inflamassoma NLRP3 de forma dependente de caspase-1 através da liberação de catepsina B e sinalização via Syk, levando a produção de IL-1 β e restrição da taxa de infecção. Adicionalmente, esses dados demonstram que os isolados encapsulados conseguem diminuir a ativação do inflamassoma.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, inflamassomas, NLRP3, IL-1 β

Abstract

Cryptococcus neoformans is an encapsulated human pathogenic fungus that affects primarily immunocompromised individuals. It has a prominent capsule that is an important virulence factor, which is involved in immune response evasion and fungal dissemination. In the present study we investigated whether *C. neoformans* was able of triggering inflammasome activation and the role of its capsule in this event. The results showed that the acapsular mutant induced high levels of IL-1 β secretion and caspase-1 activation. IL-1 β secretion induced by *C. neoformans* was assessed in WT, *Asc*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-} and *Nlrc4*^{-/-} bone marrow-derived macrophages, showing IL-1 β secretion to be dependent on NLRP3, but independent on NLRC4 inflammasome. In addition, inflammasome components were dispensable for *C. neoformans* uptake or killing. The mechanisms underlying IL-1 β processing and release were dependent on cathepsin B release following lysosomal destabilization and Syk tyrosine kinase signaling. We also demonstrate that IL-1 β signaling is not required to restrict intracellular yeast, but limited the rate of infection by an unknown mechanism. Together, our data show for the first time that acapsular *C. neoformans* activates the NLRP3 inflammasome and IL-1 β secretion in a caspase-1 dependent manner and that the mechanisms involved in this event rely on cathepsin B released during lysosomal damage and Syk signaling, leading to restriction of infection rate. Furthermore, our results show that encapsulated *C. neoformans* is able to diminish inflammasome activation.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, inflammasomes, NLRP3, IL-1 β

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas

Os fungos são microrganismos eucariotos pertencentes ao reino Fungi e que possuem uma parede celular composta por quitina e outros carboidratos. Dentre a maioria das espécies descritas até o momento, apenas cerca de 150-200 espécies foram identificadas como potenciais fungos patogênicos, ou seja capazes de causar doenças em humanos (Chakrabarti 2005).

Grande parte das infecções causadas por fungos são oportunistas e estão associadas ao aumento do número de indivíduos imunodeficientes, em especial aqueles pacientes portadores do vírus HIV, recém transplantados e pessoas acometidas por câncer ou em tratamento quimioterápico (Romani 2011). Dentre os principais fungos oportunistas estão aqueles das espécies *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Histoplasma spp.* (Chakrabarti 2005, Romani 2011). A maioria dessas infecções ocorrem através da inalação de partículas fúngicas ou devido a um desequilíbrio na homeostase do hospedeiro, o que permite a colonização do organismo por microrganismos comensais da microbiota, promovendo, desta forma, a doença.

Os fungos patogênicos são responsáveis pela infecção dos tecidos do hospedeiro e por debilitar os mecanismos de defesa do hospedeiro através de genes e proteínas responsáveis pela patogenicidade da infecção. Estes fatores são denominados fatores de virulência (Karkowska-Kuleta et al 2009). De forma geral, estes fatores de virulência estão relacionados à moléculas

que facilitam a adesão dos fungos em tecidos e à matriz extracelular do hospedeiro; produção de fosfolipases e proteases, que causam dano tecidual; a capacidade de sobreviver a 37 °C e a colonização de outros órgãos. Alguns fungos são capazes de alterar a sua morfologia durante o processo infeccioso, denominados fungos dimórficos ou polimórficos, e incluem espécies como *Candida spp.* e *Histoplasma spp.* (Faguy 2011, Hogan et al 1996, Romani 2011).

1.2 *Cryptococcus neoformans*

O fungo *Cryptococcus neoformans*, agente etiológico da criptococose, é um fungo basidiomiceto e possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em solo, troncos de árvores, vegetais em processo de apodrecimento e até mesmo em excreta de aves, principalmente em pombos (Lin 2009, Sorrell & Ellis 1997). Apesar de se reproduzir assexuadamente, já é bem estabelecido que *C. neoformans* é capaz de se reproduzir de forma sexuada, como relatado em experimentos laboratoriais. Esse processo é controlado através de um único *locus* MAT (*mating type*) que contém dois alelos idiomórficos, **a** e α . No entanto, esse tipo de reprodução ocorre em menor frequência na natureza (Lin et al 2005, Litvintseva et al 2003).

Acredita-se que a infecção ocorra através da inalação de propágulos fúngicos ou leveduras dissecadas pelo hospedeiro. Inicialmente, essas partículas de *C. neoformans* inaladas podem permanecer no trato respiratório do hospedeiro sem causar qualquer dano ao mesmo ou desenvolver uma doença assintomática (Lin & Heitman 2006). Estas podem ser eliminadas pelo organismo ou permanecer em um estado de latência. Uma vez que a

imunidade do hospedeiro esteja comprometida, esta forma latente pode voltar ao seu estado ativo, causando uma infecção local do trato respiratório ou se disseminar sistemicamente, e, desta forma, infectar outros órgãos, como o trato urinário e o sistema nervoso central (Lin & Heitman 2006).

Inicialmente, o quadro de infecção pulmonar é brando, mas pode evoluir para pneumonia grave se não tratada de forma correta (Kronstad et al 2011). Em pacientes imunocompetentes este quadro é rapidamente solucionado com o auxílio de medicamentos. Entretanto, naqueles indivíduos imunossuprimidos pode ocorrer uma disseminação sistêmica do fungo, sendo este capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, causando meningite ou meningoencefalite. É sabido que *C. neoformans* possui um tropismo para o sistema nervoso central, porém, a causa para esse fenômeno permanece desconhecida. Existem três hipóteses que tentam explicar tal fato; (1) a existência de substratos no sistema nervoso central, que seriam necessários para o crescimento de *C. neoformans*; (2) o sistema nervoso central serviria como um refúgio da resposta imune do hospedeiro contra o fungo e (3) receptores específicos em células neuronais que seriam responsáveis por atrair *C. neoformans* de forma mais eficiente do que outros órgãos durante a disseminação sistêmica (Lin & Heitman 2006).

Estima-se que a meningite causada por *C. neoformans* atinja cerca de 1 milhão de pessoas portadoras do HIV, causando por volta de 625.000 óbitos por ano (Park et al 2009). Foi reportado que *C. neoformans* também é capaz de infectar indivíduos imunocompetentes, como relatado em vários casos de infecção antes do surgimento da epidemia do HIV, porém, essas infecções ocorrem em menor frequência (Mitchell & Perfect 1995).

1.3 Cápsula e mecanismos de evasão

Além da imunidade comprometida nos indivíduos infectados, a patogenia da criptococose pulmonar ou meningite é também influenciada por uma série de fatores de virulência do fungo. Dentre eles estão: uma cápsula polissacarídica (Chang & Kwon-Chung 1994), capacidade de produzir melanina (Lin & Heitman 2006), crescimento a 37 °C, produção de urease e outras enzimas (Kozubowski et al 2009). A cápsula é um dos fatores de virulência mais importantes e muitos são os estudos envolvendo a regulação de sua síntese e manutenção (Araujo Gde et al 2012, Frases et al 2009a, Frases et al 2009b, Kmetzsch et al 2011), com o objetivo de entender de forma mais clara os mecanismos utilizados pelo fungo para evadir o sistema imune e também com a finalidade de desenvolver novas drogas antifúngicas (Liu et al 2008).

A cápsula de *C. neoformans* é composta pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), a primeira sendo de grande interesse devido às suas propriedades imunogênicas e antigênicas; e por uma pequena porção de manoproteínas (Zaragoza et al 2009). GXM possui um tamanho que varia entre 1700-7000 kDa e compõe cerca de 90% da cápsula. Estruturalmente, GXM consiste de uma cadeia principal linear de α -(1,3)-manana com resíduos de β -(1,2)-ácido glucurônico (McFadden et al 2006). GalXM possui um tamanho variável entre 100-1700 kDa e consiste 8% da composição total da cápsula. Estruturalmente, GalXM consiste de um esqueleto contendo α (1->6)-galactano e quatro ramificações curtas de oligossacarídeos (McFadden et al 2006). As manoproteínas

compõem os 2% restantes da composição total da cápsula, mas o seu papel na arquitetura da mesma não é conhecido até então (McFadden et al 2006).

Durante a interação inicial em modelos murinos de criptococose e em casos de parasitismo intracelular pode ocorrer um aumento no diâmetro da cápsula, e há algumas evidências de que isto pode estar relacionado com a resistência do fungo aos vários mecanismos efetores utilizados pelas células do sistema imune para eliminação de patógenos (Feldmesser et al 2001, McClelland et al 2006).

Este componente do patógeno desencadeia diversos processos antagônicos ao hospedeiro, tais quais: a inibição ou ativação do sistema complemento, inibição da migração celular e fagocitose por macrófagos e células dendríticas (Zaragoza et al 2003). Foi demonstrado que em determinadas situações a cápsula de *C. neoformans* pode ser capaz de reduzir a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD80 em células apresentadoras de antígeno, necessárias no processo de apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T (revisado em Zaragoza *et al.*, 2009). Além disso, componentes da cápsula, como GXM e GalXM, são capazes de induzir a apoptose de linfócitos T e macrófagos através da ativação de caspase-8 e aumento da expressão de FasL (Monari et al 2005, Pericolini et al 2006, Villena et al 2008).

A atividade efetora de células fagocíticas do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas é um dos mecanismos mais importantes para eliminação de *C. neoformans* (Voelz & May 2010). A fagocitose de *C. neoformans* pode ocorrer através da interação entre moléculas conservadas presentes em sua superfície (PAMPs) com receptores de reconhecimento de

padrão (PRRs), presentes em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Esse processo ocorre principalmente através do reconhecimento de anticorpos ou proteínas do complemento, que interagem com o fungo via receptores Fc ou do sistema complemento, respectivamente.

Um grande número de anticorpos monoclonais anti-GXM da classe IgG e IgM foram obtidos em laboratórios. Os anticorpos IgG induzem a fagocitose de *C. neoformans* através dos receptores FcγRI e FcγRIII. Até o momento, nenhum receptor Fc que interaja com esses anticorpos da classe IgM foi identificado. No entanto, estudos sugerem que a interação entre IgM e *C. neoformans* promova o rearranjo e exposição de sítios de ligação de CD18 na cápsula (Taborda & Casadevall 2002, Zaragoza et al 2009). A fagocitose mediada por proteínas do sistema complemento ocorre através do reconhecimento de moléculas de C3 depositadas na cápsula do fungo. Essas moléculas, então, podem interagir com os receptores CR1, CR3 e CR4 de células fagocíticas (Levitz & Tabuni 1991, Voelz & May 2010, Zaragoza et al 2003).

A GXM presente na cápsula do fungo é capaz de se ligar ao receptor do tipo Toll 4 (TLR4) (Shoham et al 2001) e o receptor de manose de células dendríticas se liga à manoproteínas expressas na superfície de sua cápsula, o que acabam por promover a maturação e ativação dessas células (Pietrella et al 2005). As células dendríticas, assim como os macrófagos, funcionam como uma das primeiras linhas de defesa da imunidade inata através da fagocitose. No entanto, as células dendríticas são responsáveis pela transição entre a imunidade inata e adaptativa através da apresentação de antígenos de *C. neoformans* e ativação de linfócitos T específicos em um

modelo de criptococose pulmonar (Wozniak et al 2006). Os neutrófilos auxiliam no combate ao fungo produzindo compostos oxidativos e peptídeos antimicrobianos, como as defensinas. Entretanto, devido ao baixo número de neutrófilos no foco inflamatório, sugere-se que estas células participem mais de mecanismos regulatórios do que microbicidas (Voelz & May 2010).

O papel de macrófagos em modelos de criptococose tem sido bastante estudado nos últimos anos, já que *C. neoformans* é capaz de sobreviver e proliferar no interior destas células (Feldmesser et al 2001). Esta proliferação intracelular ocorre de modo diferenciado quando observada em outros patógenos intracelulares, como *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri* (Voelz & May 2010). *C. neoformans* é capaz de se instalar e replicar no fagolisossomo, o que corrobora com o fato deste fungo ser resistente ao ambiente ácido deste compartimento. Além disso, o aumento do pH no interior do fagolisossomo pode promover a sua proliferação (Levitz et al 1999). Após intensa replicação, *C. neoformans* é capaz de sair das célula causando lise da mesma, ou através de um processo denominado exocitose não-lítica, evitando, desta forma, uma inflamação local e permitindo a infecção de células vizinhas. Isso acaba por promover a sua sobrevivência e evasão da resposta imune do hospedeiro. Esse processo é observado também em amebas infectadas com *C. neoformans* (Chrisman et al 2010, Ma et al 2006, Nicola et al 2011). Devido ao fato de *C. neoformans* possuir a capacidade de permanecer armazenado no interior dos macrófagos, alguns estudos são favoráveis à hipótese dessas células servirem como reservatórios, o que facilitaria a disseminação e posterior infecção em outros órgãos (Voelz & May 2010).

1.4 Imunidade antifúngica

Nos últimos anos, o papel da interação inicial entre microrganismos patogênicos e receptores da imunidade inata tem atraído grande interesse dos pesquisadores. Os receptores conhecidos atualmente e que desempenham funções importantes nesta interação são: os do tipo Toll (TLR); receptores do tipo lectina C (CLR); receptores do tipo RIG (RLR) e os receptores do tipo NOD (NLR), sendo estes dois últimos receptores citosólicos e com papel na imunidade contra patógenos intracelulares (Bauernfeind et al 2011, Hardison & Brown 2012). Uma grande gama de TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7 e TLR9) está associado ao reconhecimento e controle da infecção causada por fungos patogênicos, incluindo *C. albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *A. fumigatus* e *C. neoformans* (Bourgeois et al 2011, Brown 2011, Calich et al 2008, Hardison & Brown 2012).

A resposta imune protetora contra infecções fúngicas é caracterizada por um aumento nas citocinas pró-inflamatórias do padrão Th1, como IL-12 e IFN- γ , e por uma diminuição de citocinas anti-inflamatórias do padrão Th2, como IL-10 e IL-4 (Bellocchio et al 2004, Brown 2011, Netea et al 2004). A participação de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimiocinas (CXCL10) e seus receptores (CCR2 e CXCR2) também já foram descritos como essenciais para um balanço da imunidade antifúngica (Bonnett et al 2006, Carvalho et al 2010, Osterholzer et al 2008, Szymczak & Deepe 2009).

A família dos CLRs é de fundamental importância no reconhecimento e promoção da resposta antifúngica, sendo a dectina-1 o receptor mais estudado dentro desta família. Dectina-1 reconhece β -glicanas presente na parede celular de fungos, e a sua ativação está envolvida em diferentes vias de sinalizações através de adaptadores distintos, como a quinase Syk, PLC γ 2, CARD9 e Raf-1 (Reid et al 2009, Xu et al 2009). A deficiência ou mutações neste receptor estão associadas à susceptibilidade à infecções por *C. albicans* e *A. fumigatus*, e piora na produção de citocinas e mediadores inflamatórios protetores (Brown 2011). Outros CLRs, como receptor de manose, dectina-2, mincle e CD209 (DC-SIGN) também estão associados ao reconhecimento e proteção contra diversas infecções fúngicas, incluindo *C. neoformans* (Brown 2011, Gringhuis et al 2007, Robinson et al 2009, Sato et al 2006).

1.5 NLRs e inflamassomas

A família dos receptores citosólicos NLRs tem sido bastante estudada em modelos de infecções bacterianas e virais, mas pobremente em infecções fúngicas. Cerca de 34 genes de NLRs já foram identificados até então, e análises filogenéticas revelaram três subfamílias desses receptores: NODs, NLRPs e IPAF (Schroder & Tschopp 2010, Tian et al 2009). A estrutura desses receptores é dividida em três partes, que consistem de uma porção C-terminal rica em repetições de leucina; um domínio central NACHT associado a um domínio adicional, conhecido como NAD; e um domínio efetor N-terminal, que é responsável pelo início da sinalização (Bauernfeind et al 2011).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado a importância desses receptores na imunidade contra patógenos intracelulares. Frente a determinados estímulos, alguns NLRs são capazes de se oligomerizar e levar a formação de um complexo multiprotéico denominado inflamassoma. Este complexo é responsável pela clivagem e ativação da enzima pro-caspase-1 em caspase-1, que exerce um papel fundamental no processamento e maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Schroder & Tschopp 2010). Esse processo é finamente regulado e para que ocorra de forma completa dois sinais são necessários: (1) o primeiro é proveniente da sinalização por PRRs que induzem a ativação do fator de transcrição NF- κ B, promovendo a transcrição de pró-IL-1 β e pró-IL-18; (2) o segundo sinal consiste no processamento proteolítico desses precursores em suas formas biologicamente ativas via caspase-1, a qual é ativada pelo inflamassoma. Até então, vários NLRs capazes de formar o complexo do inflamassoma já foram descritos, dentre eles: NLRP1, NLRP3 (NALP3), NLRP6, NLRC4 (IPAF) e AIM2 (Lamkanfi & Dixit 2012). Dentre todos os inflamassomas até hoje descritos, o mais bem estudado e caracterizado é o NLRP3.

Cada um destes receptores parecem ser responsáveis por responderem a estímulos distintos e específicos. Por exemplo, NLRP1 participa no reconhecimento citosólico da toxina letal de *Bacillus anthracis* e é fundamental para o controle da infecção (Boyden & Dietrich 2006). NLRP6 possui poucas funções conhecidas, mas está relacionado com a manutenção da microbiota intestinal e proteção contra o câncer de cólon (Chen et al 2011, Elinav et al 2011), além de ter sido relatado recentemente como um regulador negativo da resposta imune em infecções bacterianas (Anand et al 2012). O

inflamassoma AIM2 participa no reconhecimento de DNA citosólico proveniente de vírus e bactérias (Fernandes-Alnemri et al 2009, Warren et al 2010). Já o inflamassoma NLRC4 é responsável pelo reconhecimento de flagelina e componentes do sistema de secreção do tipo III de bactérias (Miao et al 2006, Miao et al 2010).

Diferentemente dos receptores citados anteriormente, o inflamassoma NLRP3 é responsável por reconhecer uma vasta gama de agentes infecciosos, incluindo diversas bactérias (Franchi et al 2012, Lamkanfi & Dixit 2012); os fungos *A. fumigatus*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Gross et al 2009, Hise et al 2009, Joly et al 2009, Said-Sadier et al 2010); alguns vírus, como o influenza A (Allen et al 2009); e o parasita *Schistosoma mansoni* (Ritter et al 2010). Além disso, é postulado que essa grande gama de patógenos ative NLRP3 de forma indireta, e que este receptor seja responsável por reconhecer danos celulares e teciduais, já que NLRP3 é ativado frente a estímulos endógenos como ATP (Mariathasan et al 2006), cristais de ácido úrico (Martinon et al 2006) e fibrilas de β -amilóide (Halle et al 2008).

1.6 Inflamassomas não-canônicos

Até pouco tempo pensava-se que os inflamassomas eram responsáveis apenas por ativar caspase-1 para a maturação de IL-1 β e IL-18. No entanto, estudos recentes demonstram que ocorre a ativação de vias não-canônicas, que também levam ao processamento e maturação de IL-1 β , e que são dependentes de caspase-11 e caspase-8, mas não de caspase-1 (Dupaul-Chicoine & Saleh 2012, Kayagaki et al 2011).

O inflamassoma não-canônico que é responsável por ativar caspase-11 é estimulado frente a infecções por bactérias Gram-negativas, mas não Gram-positivas, e sinalização via IFN do tipo I. Postula-se, também, que caspase-11 auxilie na ativação de caspase-1 dependente de NLRP3 (Rathinam et al 2012b). Já o inflamassoma de caspase-8 é ativado através da interação entre dectina-1, que leva à formação do complexo Syk-CARD9-Bcl-10-MALT1-caspase-8 e posterior maturação de IL-1 β . Foi demonstrado que algumas linhagens de *C. albicans*, *A. fumigatus* e várias espécies de *Mycobacterium* induzem secreção de IL-1 β via caspase-8 (Gringhuis et al 2012).

1.7 Justificativa

Como mencionado anteriormente, estudos relatam que o inflamassoma NLRP3 exerce um importante papel na imunidade inata contra infecções fúngicas causadas por *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *A. fumigatus*. Entretanto, o papel dos inflamassomas ainda são negligenciados em infecções fúngicas. Até o presente momento, os trabalhos envolvendo a regulação dos inflamassomas frente a infecção por *C. neoformans* são inexistentes. Pesquisas que dêem atenção à interação entre *C. neoformans* e os receptores NLRs podem levar a um melhor entendimento do papel da imunidade inata na regulação da resposta imune contra infecções fúngicas, além de possibilitar novas alternativas para o desenvolvimento de fármacos terapêuticos. Desta forma, a proposta geral deste projeto consiste na investigação do papel do inflamassoma em macrófagos infectados por *C.*

neoformans, bem como o papel de sua cápsula na regulação desse processo.

1.8 Objetivos

Objetivo geral

Investigar o processo de ativação do inflamassoma em macrófagos infectados *in vitro* por *Cryptococcus neoformans*

Objetivos específicos

1. Analisar a ativação do inflamassoma por leveduras encapsuladas e acapsuladas
2. Investigar o papel de proteínas, como NLRP3, ASC, Caspase-1 e NLRC4 na secreção de IL-1 β
3. Definir os mecanismos moleculares que levam à ativação do inflamassoma
4. Verificar o papel e contribuição do inflamassoma no controle da infecção

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Durante este trabalho, foram utilizados camundongos C57BL/6 entre 8-12 semanas de idade. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e utilizados de acordo com as regras do Comitê de Ética da Universidade de Brasília. Fêmurs de camundongos *Asc^{-/-}*, *Casp1^{-/-}* e *Nlrp4^{-/-}* foram obtidos de animais provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-FMRP). Fêmurs de camundongos *Nlrp3^{-/-}* foram uma gentil contribuição do Dr. Jürgen Brojatsch (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY).

2.2 Cultura celular

Diferentes tipos celulares foram utilizados no decorrer deste estudo, dentre elas; macrófagos derivados de medula óssea (BMM), macrófagos peritoneais e uma linhagem de monócitos humano (THP-1). Todas as células foram mantidas em estufa de CO₂ 5% e umidificada a 37 °C.

Macrófagos derivados de medula óssea foram diferenciados através de um protocolo previamente estabelecido (Marim et al 2010). Os camundongos foram sacrificados através de asfixia com CO₂, seguido pela retirada do fêmur e tíbia das duas patas. As extremidades do fêmur e tíbia foram cortadas, e foi realizado um lavado do interior destes utilizando-se uma seringa de 1 mL contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) não suplementado, a fim de se obter as células progenitoras. Posteriormente, as células foram contadas, centrifugadas a 300g e 4 °C durante 5 minutos e,

ressuspendidas em meio de diferenciação de macrófagos (20% SBF; 30% LCCM; 50% RPMI-1640). As células foram plaqueadas em uma concentração de 4×10^6 em placas de Petri em 10 mL de meio de diferenciação. Após 4 dias, mais 10 mL de meio de diferenciação foi adicionado à cultura. No sétimo dia, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram incubadas em PBS 1X estéril gelado a 4 °C durante 10 minutos. As células foram desaderidas gentilmente, contadas e plaqueadas na concentração desejada em meio de experimentação (10% SBF; 5% LCCM; 85% RPMI-1640). Os macrófagos diferenciados permaneceram em repouso por 24 horas antes da sua utilização em qualquer experimento. Após esse período, o meio de experimentação foi substituído por um novo antes do início dos experimentos.

Para obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos foram tratados com 1,5 mL de tioglicolato 3% (Biobrás). Após 4 dias, os animais foram sacrificados e foi realizado o lavado peritoneal, utilizando-se uma seringa contendo 10 mL de RPMI não suplementado. As células foram centrifugadas a 300g e 4 °C durante 5 minutos, ressuspendidas em RPMI gelado, contadas e plaqueadas na concentração desejada. Após 1 hora, as células não aderidas foram lavadas, e foi acrescentado RPMI a 37 °C suplementado com 10% de SBF. Os macrófagos foram utilizados para experimento após 24 horas de repouso.

A linhagem de monócito humano (THP-1) foi obtida através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ) e mantida através de passagens em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 50 µg/ml de gentamicina.

2.3 Fungos

No decorrer deste trabalho foi utilizado o fungo patogênico *C. neoformans* como modelo de infecção. A linhagem B3501 (sorotipo D) e um mutante deficiente de cápsula (CAP67; construído no *background* de B3501) foram obtidos do laboratório do Dr. Arturo Casadevall (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). As leveduras foram armazenadas em estoques congelados a -80 °C em solução de glicerol 30%. Previamente a cada experimento, leveduras derivadas de estoques congelados foram inoculadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose durante 48 horas e sob agitação constante a 150-200 rpm e 30 °C. Posteriormente, as leveduras foram lavadas com PBS estéril, ressuspensas em RPMI e ajustadas para a concentração desejada. O inóculo foi opsonizado com soro murino (10%), humano (10%) ou anticorpo monoclonal anti-GXM 18B7 (10 µg/mL; contribuição de Arturo Casadevall) (Casadevall et al 1998) durante 1 hora a 37 °C. Em experimentos nos quais as células foram infectadas com leveduras mortas, B3501 e CAP67 foram aquecidos a 90 °C durante 40 minutos e em seguida opsonizadas como mencionado anteriormente.

2.4 Infecção *in vitro*

Para a realização dos experimentos *in vitro*, macrófagos derivados de medula óssea, macrófagos peritoneais ou monócitos THP-1 foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços em uma concentração de 1×10^6 em 500 µL. Antes da infecção, as células foram tratadas com LPS (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) durante 4 horas.

A fim de caracterizar alguns mecanismos envolvidos na resposta inflamatória, as células foram tratadas com diferentes inibidores após o tratamento com LPS por 60 minutos. As drogas utilizadas foram CA074-Me (25 μ M; Sigma-Aldrich), um inibidor de catepsina B e picetanol (50 μ M; Sigma-Aldrich), um inibidor da proteína adaptadora Syk quinase.

Após o tratamento com os inibidores citados, as células foram infectadas com diferentes multiplicidades de infecção (MOI) com as linhagens B3501 ou CAP67 opsonizados por um período de 3, 6, 12 ou 24 horas. Como controle positivo para a secreção de IL-1 β , as células foram tratadas com ATP (5 mM; 60 minutos; Invivogen) ou nigericina (20 μ M; 40 minutos; Invivogen) logo antes da coleta do sobrenadante. O sobrenadante de cultura coletado foi utilizado para dosagem de citocinas.

2.5 Ensaio de fagocitose e morte

Para o estudo do papel de componentes do inflamassoma na fagocitose e morte intracelular de *C. neoformans* pelo macrófago, macrófagos derivados de medula óssea selvagem (WT) ou deficientes para as proteínas ASC, caspase-1 ou NLRC4 foram plaqueados em placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^4 células por poço. As células foram tratadas com LPS (1 μ g/mL) durante 4 horas e, em seguida, infectadas com a linhagem B3501 opsonizada com anticorpo 18B7 (10 μ g/mL). Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas 5 vezes com 200 μ L de PBS estéril para remover o máximo de leveduras não fagocitadas. O meio de cultura foi substituído e a ele foi adicionado fluconazol, um agente fungistático, (20 μ g/mL; Sigma-Aldrich) para impedir a ação de leveduras extracelulares (Qin

et al 2011). As células, então, permaneceram em cultura por mais 21 horas. Após esse tempo, as células foram lisadas em 100 µL de uma solução aquosa contendo 0,05% SDS. As leveduras que haviam sido internalizadas e foram liberadas após a lise celular foram diluídas (1:100) em PBS estéril. Desta diluição, 100 µL foram plaqueados em placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar e incubadas em uma estufa a 30 °C. Após 48 horas foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU). O ponto de 3 horas também foi plaqueado como um controle da quantidade de leveduras que haviam sido internalizadas para posterior comparação do índice de morte entre os grupos.

2.6 Detecção de caspase-1 ativa

No presente estudo, a detecção de caspase-1 ativa foi obtida através da utilização de um kit específico e manipulado de acordo com as instruções do fabricante: FLICA FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry). Este kit é composto por uma sonda fluorescente que se liga de forma irreversível à uma subunidade específica de caspase-1 clivada. Macrófagos infectados por 24 horas com as linhagens B3501 ou CAP67 opsonizados foram submetidos à marcação com FLICA, e posteriormente analisados por citometria de fluxo (BD LSR II, BD Biosciences). Foram obtidos 10.000 eventos de cada grupo, utilizando-se o canal de fluorescência do FITC. O *gate* foi plotado na população celular homogênea, excluindo-se os debris da análise.

2.7 Western blot

O método *Western blot* foi utilizado para identificação de caspase-1 clivada e secretada por células infectadas com *C. neoformans*. Após a estimulação, o sobrenadante da cultura foi coletado, diluído em tampão de amostra Laemmli e armazenado a -80 °C. As células foram lisadas com 50 µL de uma solução composta por tampão de lise RIPA (Sigma-Aldrich) e um coquetel de inibidor de protease (1X). Posteriormente, as amostras foram coletadas e centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante das amostras foi coletado, diluído em tampão de amostra Laemmli e armazenado a -80 °C. As amostras do lisado celular e sobrenadante foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; 4-15%). O gel foi transferido para membranas PVDF (Invitrogen) e logo em seguida as membranas foram coradas com Ponceau para verificação da integridade das bandas. Após isso, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente em uma solução composta por: tampão TBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico) e 0,1% Tween20 (Sigma-Aldrich). As membranas, então, foram incubadas com anticorpo primário monoclonal contra a subunidade p20 de caspase-1 murina (Santa Cruz Biotechnology; 1:500) *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com solução TBS + 0,1% Tween20 sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:3000) durante 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz. Após a marcação com o anticorpo secundário as membranas foram lavadas 5 vezes sob agitação. Finalmente, as membranas foram tratadas com 500 µL de cada um dos reagentes provenientes do kit *SuperSignal West Pico*

Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) durante 1 minuto. As membranas foram expostas a filmes de raio-X durante intervalos que variavam de 5 a 30 minutos, e em seguida reveladas com soluções reveladoras e fixadoras (Kodak).

2.8 Dosagem de citocinas

As citocinas proveniente do sobrenadante da cultura foram analisadas pelo método ELISA, utilizando-se kits comerciais (eBioscience). O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL).

2.9 Análise estatística

Os resultados apresentados nesse trabalho tratam-se de um experimento representativo de pelo menos três ensaios independentes. As análises estatística foram realizadas utilizando o teste *t Student* de dados não paramétricos. O software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software) foi utilizado para as análises. Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 *C. neoformans* induz a secreção de IL-1 β em células primadas com LPS

Para verificar se a infecção induzida pelo *C. neoformans* era capaz de gerar um sinal suficiente para induzir a secreção de IL-1 β *in vitro*, macrófagos peritoneais primados ou não com LPS ou ATP foram infectados com a linhagem B3501, e o sobrenadante coletado após 24 horas para análise de IL-1 β secretada. Foi observado que as células primadas com LPS e infectadas foram capazes de secretar IL-1 β , enquanto as células apenas infectadas ou infectadas e tratadas com ATP não (Figura 1A), e o mesmo foi observado na infecção com CAP67, um mutante acapsular de *C. neoformans* (dados não mostrados). Células apenas primadas com LPS ou tratadas apenas com ATP também não secretaram níveis significativos de IL-1 β (Fig 1B). Foi realizada também uma cinética da secreção de IL-1 β , sendo o pico de sua produção ocorrendo 24 horas após a infecção (Fig 1C). Esses dados sugerem que para a eficiente secreção de IL-1 β por macrófagos são necessários dois sinais de ativação e que *C. neoformans* estimula um segundo sinal à célula.

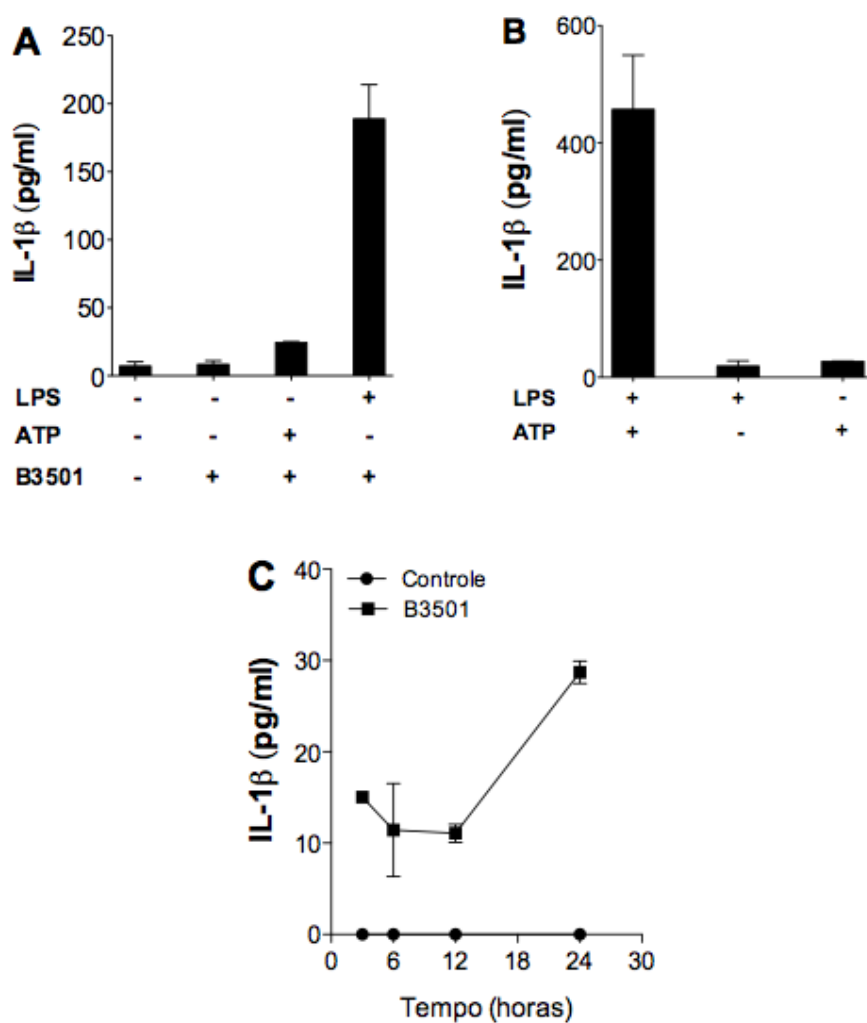


Figura 1. *C. neoformans* induz a secreção de IL-1 β em células primadas. (A) Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais após 24 horas de infecção *in vitro* com B3501 (MOI 3) na presença ou ausência de LPS (1 μ g/mL) ou ATP (5 mM). (B) Níveis de IL-1 β secretados por macrófagos peritoneais na presença de LPS, ATP ou LPS + ATP. (C) Cinética da secreção de IL-1 β por monócitos THP-1 infectados ou não com B3501 (MOI 5). Nas figuras A e B os fungos foram opsonizados previamente a infecção com soro murino (10%) durante 30 minutos, enquanto na figura C os fungos foram opsonizados da mesma forma com soro humano.

3.2 A viabilidade de *C. neoformans* é necessária para a indução da secreção de IL-1 β

Estudos anteriores relatam a viabilidade de células fúngicas como um fator crucial para a ativação do inflamassoma e secreção de IL-1 β . Com o objetivo de entender se a viabilidade de *C. neoformans* desempenhava alguma participação nesse processo, macrófagos derivado de medula óssea foram infectados com *C. neoformans* viável ou inativado pelo calor, e a secreção de IL-1 β foi verificada após 24 horas de infecção. Como visto em estudos anteriores, células infectadas com leveduras não viáveis não foram capazes de induzir a secreção de IL-1 β (Figura 2), e o mesmo fenômeno foi observado na infecção com a linhagem acapsular CAP67 (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a viabilidade de *C. neoformans* é um fator crucial durante a infecção para que a célula do hospedeiro induza a ativação do inflamassoma.

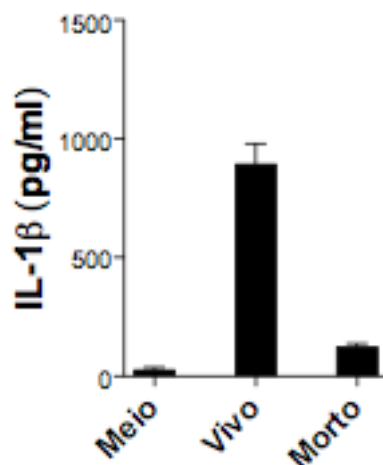


Figura 2. A viabilidade de *C. neoformans* é necessária para a indução da secreção de IL-1 β . Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de macrófagos derivados de medula óssea após 24 horas de infecção com leveduras de B3501 (MOI 2) viáveis ou inativadas pelo calor. As células foram tratadas com LPS (1 μ g/mL) durante 4 horas antes da infecção. Os fungos foram opsonizados com soro murino (10%) durante 30 minutos antes da infecção.

3.3 *C. neoformans* encapsulado e acapsular induzem secreção diferencial de IL-1 β

A cápsula de *C. neoformans* é um dos fatores de virulência mais importantes e bem estudados durante o processo de infecção. Com o objetivo de verificar se a cápsula desempenhava algum papel na indução da secreção de IL-1 β , diferentes tipos celulares (monócitos humanos THP-1, macrófagos peritoneais e macrófagos derivados de medula óssea) foram infectados com as linhagens B3501 (encapsulado) ou CAP67 (mutante acapsular). Os níveis

de IL-1 β do sobrenadante foram detectados por ELISA após 24 horas de infecção. O isolado acapsular estimulou uma maior secreção de IL-1 β por todos os tipos celulares (Figura 3). Estes dados sugerem que o isolado encapsulado do *C. neoformans* desenvolve um papel modulador da ativação do inflamassoma durante a infecção, levando a uma diminuição da produção de IL-1 β pelo hospedeiro.

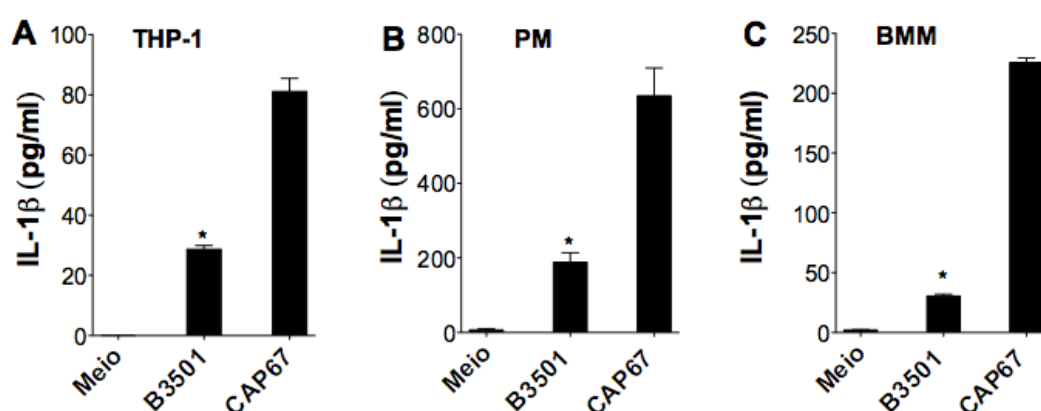


Figura 3. *C. neoformans* encapsulado e acapsular induzem secreção diferencial de IL-1 β . Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de monócitos humanos THP-1 (THP-1) (A), macrófagos peritoneais (PM) (B) ou macrófagos derivados de medula óssea (BMM) (C) após 24 horas de infecção com *C. neoformans* encapsulado (B3501; MOI 2) ou acapsular (CAP67; MOI 2). As células foram tratadas com LPS (1 μ g/mL) durante 4 horas antes da infecção. Os fungos utilizados para infecção de PM e BMM foram opsonizados com soro murino (10%) durante 30 minutos, enquanto aqueles utilizados em THP-1 foram opsonizados da mesma forma com soro humano (10%). * $P < 0.05$.

3.4 A ativação de caspase-1 ocorre apenas na ausência da cápsula

Como demonstrado anteriormente, a linhagem encapsulada de *C. neoformans* induz uma menor secreção de IL-1 β comparado ao mutante acapsular. A atividade da enzima caspase-1 possui um importante papel no processamento e maturação de IL-1 β . Pro-caspase-1 é uma proteína de 45 kDa e possui localização citoplasmática. Quando ativada, esta enzima é clivada em subunidades de 10 ou 20 kDa, sendo grande parte dessas subunidades secretadas pela célula. Por este motivo, foi verificada a ativação de caspase-1 em BMM infectados com as linhagens encapsuladas ou acapsular de *C. neoformans*. Surpreendentemente, foi visto que as células infectadas com B3501 falharam em ativar caspase-1, enquanto aquelas infectadas com CAP67 exibiram uma forte ativação da mesma (Figura 4). Estes resultados podem explicar o porquê da maior indução de secreção de IL-1 β em células infectadas com CAP67 em comparação com aquelas infectadas com B3501. Pode-se sugerir, desta forma, que o isolado encapsulado de *C. neoformans* consegue diminuir a ativação de caspase-1.

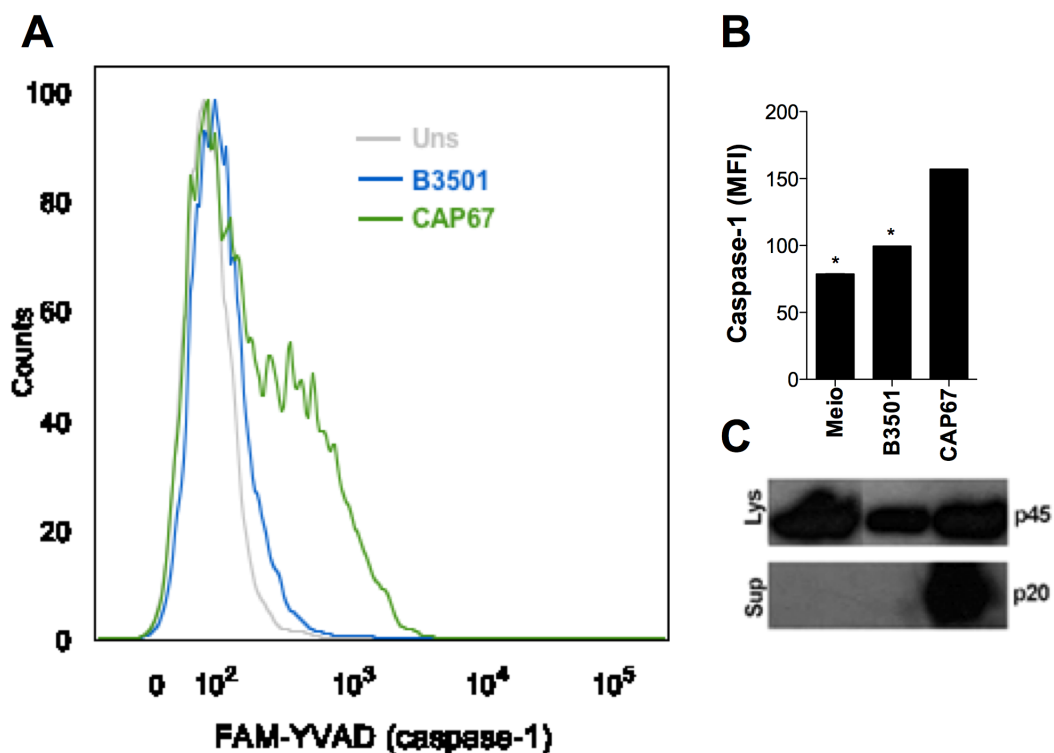


Figura 4. A ativação de caspase-1 ocorre apenas na ausência da cápsula. Macrófagos derivado de medula óssea infectados com (A) *C. neoformans* encapsulado (B3501; MOI 2; azul) ou acapsular (CAP67; MOI 2; verde) durante 24 horas foram tratados com a sonda FAM-YVAD-FMK para a análise de caspase-1 ativa por citometria de fluxo (histograma). (B) Os valores da média de intensidade de fluorescência (MFI) também foram plotados em um gráfico. (C) Foi realizado um *western blotting* de extratos celulares (Lys) e sobrenadante da cultura (Sup) de macrófagos infectados com *C. neoformans* encapsulado (B3501; MOI 2) ou acapsular (CAP67; MOI 2) durante 24 horas para detecção da subunidade ativa de caspase-1 (p20). A proteína precursora pro-caspase-1 (p45) foi utilizada como controle interno. Os fungos foram opsonizados com soro murino (10%) durante 30 minutos. * $P < 0.05$.

3.5 *C. neoformans* ativa o inflamassoma NLRP3

Para identificar qual o receptor e componentes do inflamassoma envolvidos no reconhecimento e na secreção de IL-1 β na infecção por *C. neoformans*, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *knockout* para as proteínas NLRP3, ASC, Caspase-1 e NLRC4 foram infectados com B3501 ou CAP67 para posterior verificação dos níveis de IL-1 β do sobrenadante da cultura. Foi observado que células deficientes para as proteínas NLRP3, ASC e caspase-1 não foram capazes de secretar IL-1 β frente à infecção por *C. neoformans*, enquanto células deficientes para a molécula NLRC4 secretaram IL-1 β de maneira semelhante às células de camundongos selvagem (WT) (Figura 5A). As células deficientes para todas essas proteínas foram tratadas com LPS e nigericina - uma toxina bacteriana envolvida na ativação de NLRP3 - como controle (Figura 5B). Estes dados revelam que a infecção induzida por *C. neoformans* leva à ativação do inflamassoma NLRP3, que recruta a proteína adaptadora ASC e posteriormente caspase-1, levando ao processamento e maturação de IL-1 β .

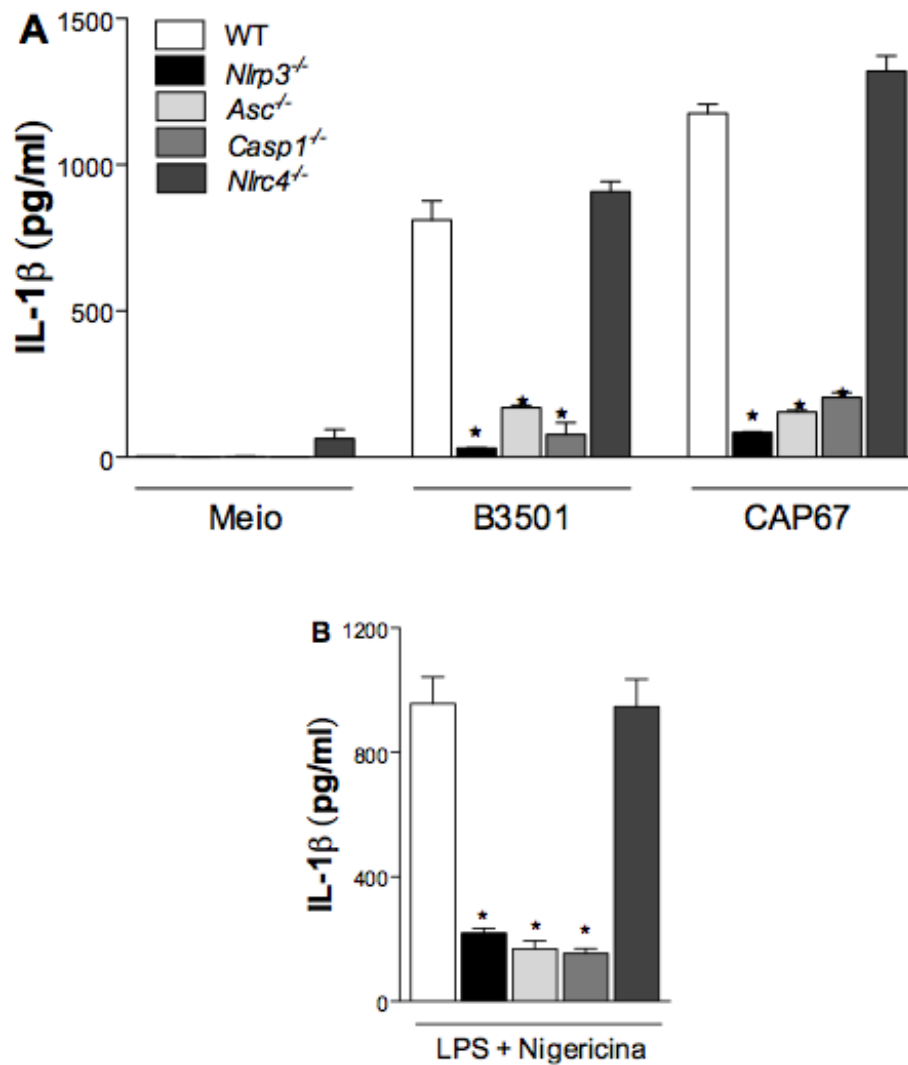


Figura 5. *C. neoformans* ativa o inflamassoma NLRP3. (A) Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de BMM selvagem (WT) ou *knockouts* para as proteínas NLRP3, ASC, caspase-1 ou NLRC4 infectados com *C. neoformans* encapsulado (B3501; MOI 2) ou acapsular (CAP67; MOI 2) durante 24 horas. (B) Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de BMM selvagem (WT) ou deficientes para as proteínas NLRP3, ASC, caspase-1 ou NLRC4 tratados com LPS (1 μ g/mL; 4 horas) e nigericina (20 μ M; 40 minutos). Os fungos foram opsonizados com soro murino (10%) durante 30 minutos. * $P < 0.05$.

3.6 Mecanismos que levam à ativação de NLRP3 na infecção por *C. neoformans*

Vários mecanismos estão associados à ativação indireta do inflamassoma NLRP3, sendo que os mais conhecidos e bem estudados são as espécies reativas de oxigênio (ROS), efluxo de potássio e dano lisossomal, que libera enzimas, como a catepsina B. Para verificar se algum destes mecanismos estavam envolvidos na ativação de NLRP3 durante a infecção por *C. neoformans*, macrófagos derivados de medula óssea foram tratados com um inibidor seletivo para catepsina B antes de serem infectados com leveduras de *C. neoformans*. Foi observado que o tratamento com esse inibidor levou a uma diminuição dos níveis secretados de IL-1 β (Figura 6A), mas não de TNF- α (Figura 6B). Foi também investigado o papel da quinase Syk, que possui uma importante participação na sinalização intracelular que leva à produção de diversas citocinas frente a infecções fúngicas. Para isso, estas mesmas células foram tratadas com um inibidor para Syk antes da infecção. Assim como observado nos resultados anteriores, a inibição de Syk também levou a uma diminuição nos níveis secretados de IL-1 β (Fig. 6A), mas não de TNF- α (Fig. 6B). Estes dados sugerem que os mecanismos moleculares que levam a ativação de NLRP3 durante a infecção por *C. neoformans* dependem de catepsina B liberada durante o dano lisossomal e da proteína quinase Syk, e que esses mecanismos possivelmente possuem participação exclusiva para secreção de IL-1 β e não TNF- α .

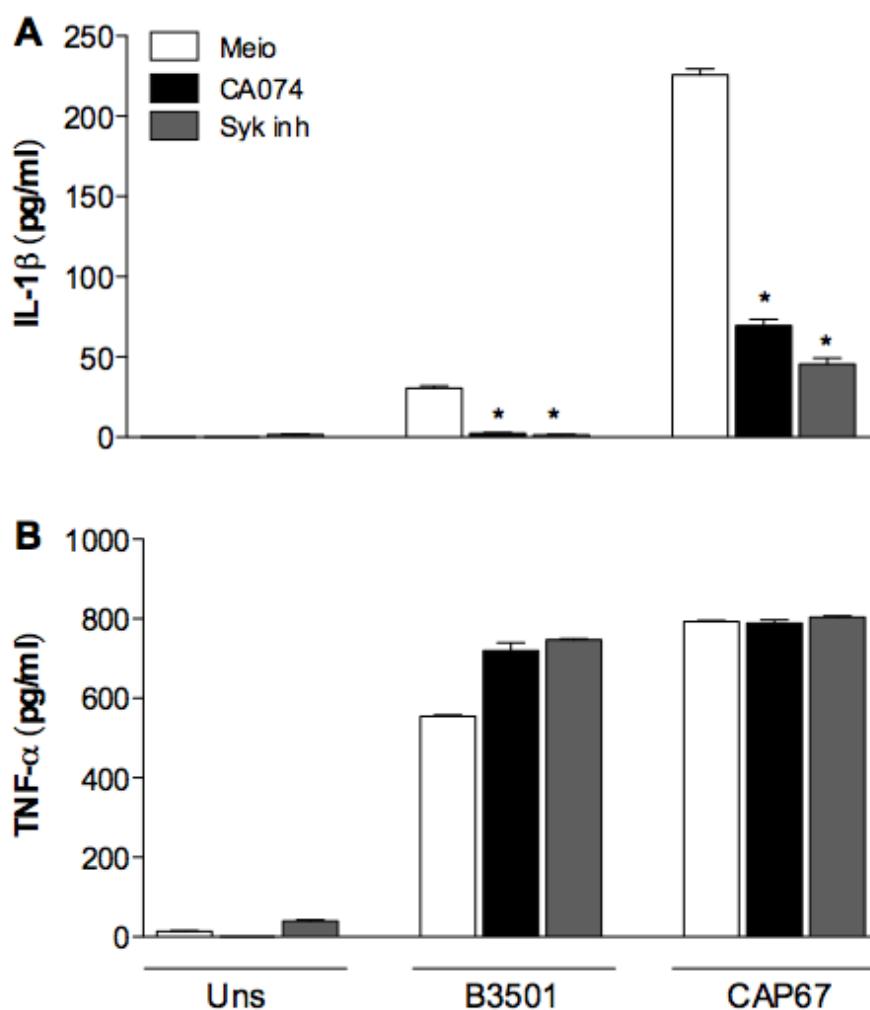


Figura 6. A ativação do inflamassoma depende do dano lisossomal e sinalização via Syk quinase. (A) Níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de BMM infectados ou não (Uns) e tratados com inibidores para catepsina B (CA074-Me; 25 μ M) ou Syk (picetanol; 50 μ M). (B) Níveis de TNF- α no sobrenadante da cultura de BMM tratados com os mesmos inibidores e concentrações utilizados em (A). Todos os tratamentos foram realizados durante 1 hora antes da infecção com B3501 ou CAP67 (MOI 2). Os fungos foram opsonizados com soro murino (10%) durante 30 minutos. * $P < 0.05$.

3.7 O papel do inflamassoma na fagocitose de leveduras de *C. neoformans*

Baseado nos resultados anteriores que confirmam a ativação do inflamassoma na infecção induzida por *C. neoformans*, foi investigado o papel dos componentes do inflamassoma na fagocitose e no controle da infecção *in vitro*. Para isso, macrófagos derivados de medula óssea selvagem ou *knockout* para as proteínas ASC, caspase-1 ou NLRC4 foram infectados com leveduras encapsuladas de *C. neoformans*. Após 3 horas de infecção, os macrófagos foram lisados e foi realizada uma quantificação das unidades formadoras de colônias (CFU) para verificar se os componentes do inflamassoma desempenhavam algum papel na internalização de leveduras. Foi observado que tanto macrófagos WT quanto aqueles *knockout* para as diferentes proteínas do inflamassoma internalizaram as leveduras de *C. neoformans* de forma equivalente (Figura 7). Os resultados sugerem que o inflamassoma não possui um papel fundamental para a internalização eficiente de leveduras.

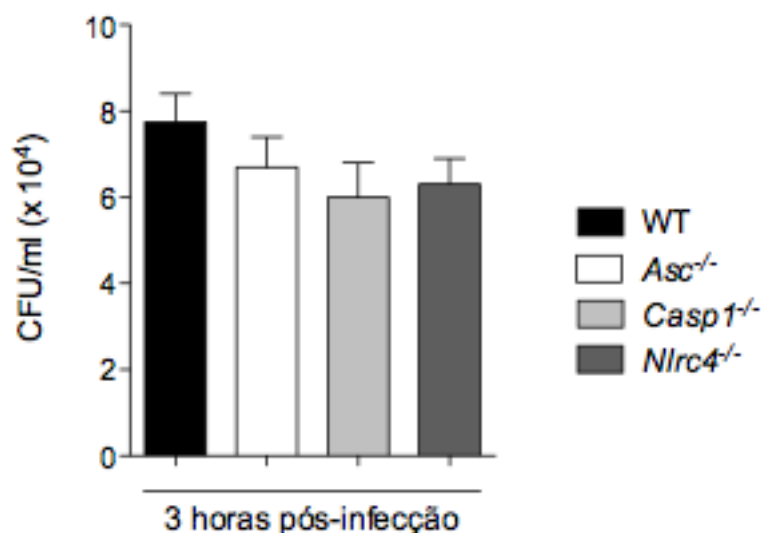


Figura 7. A fagocitose de leveduras ocorre normalmente na ausência do inflamassoma. BMM selvagens ou deficientes para as proteínas ASC, caspase-1 ou NLRC4 foram infectados com a linhagem B3501 (MOI 2) previamente opsonizadas com anticorpo 18B7 (10 µg/mL). Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas, lisadas com solução aquosa contendo 0.05% SDS e diluições desse lisado foram plaqueadas em meio Sabouraud Agar por 2 dias a 30 °C. Os gráficos representam a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU/mL).

3.8 O papel do inflamassoma no controle da infecção induzida por *C. neoformans*

O papel do inflamassoma no controle da infecção também foi avaliado de forma semelhante ao índice de fagocitose. Os macrófagos WT ou deficientes para ASC, caspase-1 ou NLRC4 com leveduras encapsuladas internalizadas após 3 horas permaneceram em cultura por mais 21 horas, analisando-se,

posteriormente, a quantificação das unidades formadoras de colônias. Os resultados mostram que tanto macrófagos WT quanto aqueles deficientes para ASC, caspase-1 ou NLRC4 controlaram a infecção de forma semelhante no tempo de 24 horas quando comparado ao tempo de 3 horas (Figura 8A). As células também foram incubadas com leveduras de *C. neoformans* sem nenhuma interferência durante 24 horas. Os resultados se mostraram similares quando as unidades formadoras de colônias foram analisadas (Figura 8B). Estes dados sugerem que apesar do inflamassoma ser ativado durante a infecção por *C. neoformans*, ele não está diretamente relacionado com o controle da infecção de leveduras internalizadas.

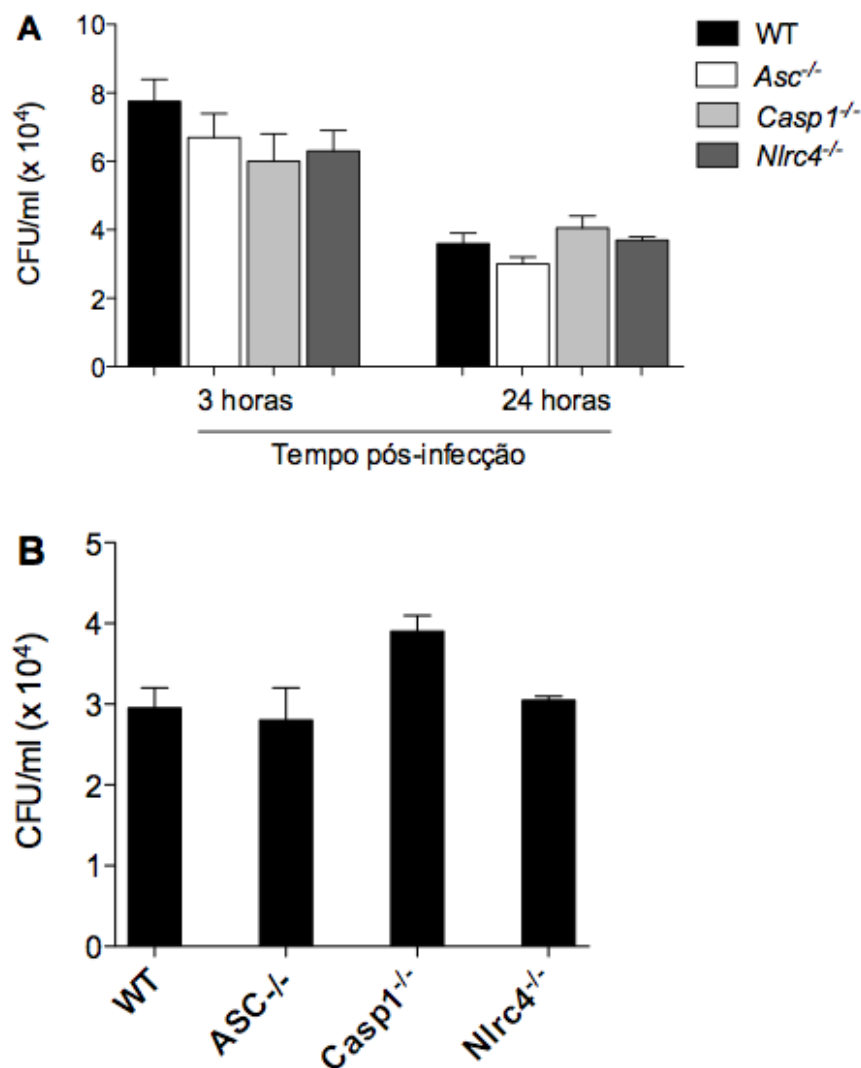


Figura 8. Componentes do inflamassoma como ASC, caspase-1 e NLRC4 não participam do controle da infecção. BMM selvagens ou deficientes para as proteínas ASC, caspase-1 ou NLRC4 foram infectados com a linhagem B3501 (MOI 2) previamente opsonizada com anticorpo 18B7 (10 μ g/mL). (A) Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas, lisadas com solução aquosa contendo 0.05% SDS e plaqueadas em Sabouraud Agar a 30 °C por 2 dias. Um segundo grupo de células foi lavado e o meio substituído por um suplementado com o agente fungistático fluconazol (20 μ g/mL). Após 21

horas, essas células foram lavadas, lisadas e o conteúdo plaqueado da mesma maneira que o grupo com 3 horas de infecção. (B) Células infectadas sem qualquer interferência no processo durante 24 horas. Após esse tempo as células foram lavadas, lisadas e o conteúdo plaqueado da mesma maneira feita em (A). Os gráficos representam a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU/mL).

3.9 O papel da sinalização da citocina IL-1 β na restrição de leveduras internalizadas

Com a finalidade de entender importância da secreção de IL-1 β resultante da ativação do inflamassoma por *C. neoformans*, o papel funcional da sinalização de IL-1 β na restrição de leveduras internalizadas foi investigado. Para isso, macrófagos com leveduras encapsuladas de *C. neoformans* internalizadas foram tratados com diferentes concentrações de IL-1 β recombinante durante 24 horas. Passado o tempo, foi realizada a quantificação das unidades formadoras de colônia. Foi visto que as unidades formadoras de colônias foram semelhantes tanto nas células tratadas quanto não tratadas com IL-1 β em diferentes concentrações (Figura 9), desta forma, os resultados sugerem que a sinalização de IL-1 β não possui papel fundamental na restrição de leveduras com localização intracelular.

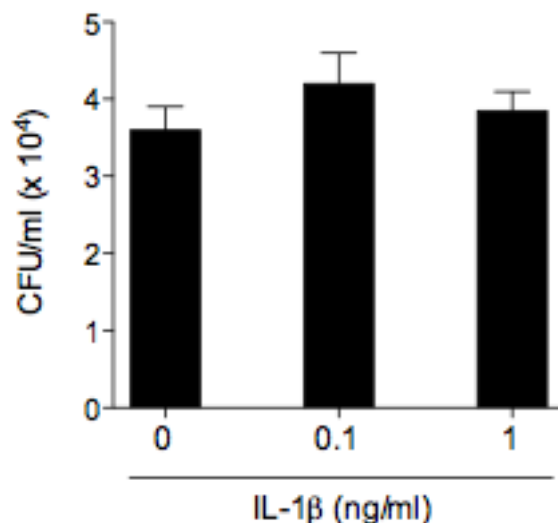


Figura 9. A sinalização por IL-1 β não contribui para o controle da infecção. BMM selvagens foram infectados com a linhagem B3501 (MOI 2) previamente opsonizada com anticorpo 18B7 (10 μ g/mL). Após 3 horas, as células foram lavadas e o meio substituído por um novo suplementado com IL-1 β recombinante em diferentes concentrações. Após 21 horas, as células foram lavadas, lisadas com solução aquosa contendo 0.05% SDS e diluições do lisado foram plaqueadas em Sabouraud Agar a 30 °C por 2 dias. Os gráficos representam a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU/mL).

3.10 O papel de IL-1 β na restrição de leveduras extracelulares

Como a sinalização de IL-1 β não era responsável por auxiliar na restrição de leveduras internalizadas, foi hipotetizado que, talvez, IL-1 β pudesse ter um papel no auxílio do controle de leveduras que ainda não haviam sido internalizadas. Para verificar esta hipótese, as células foram tratadas ou não

com diferentes concentrações de IL-1 β recombinante simultaneamente a infecção por um período de 24 horas, e as unidades formadoras de colônias analisadas posteriormente. Surpreendentemente, as células tratadas com IL-1 β recombinante resultaram em uma menor carga fúngica do que o grupo de BMM não tratados (Figura 10). Estes dados sugerem que IL-1 β estaria agindo de alguma forma durante a infecção para auxiliar no controle de leveduras não internalizadas por um mecanismo ainda desconhecido.

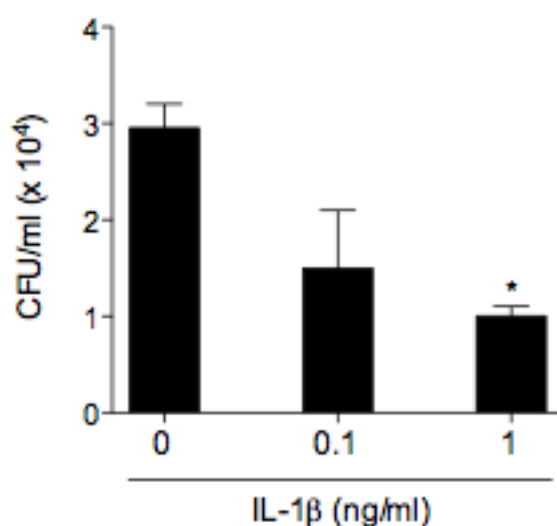


Figura 10. IL-1 β limita a taxa de infecção em BMM. BMM selvagens foram infectados com a linhagem B3501 (MOI 2) previamente opsonizada com anticorpo 18B7 (10 μ g/mL) e ao mesmo tempo tratados com IL-1 β recombinante em diferentes concentrações. Após 24 horas, as células foram lavadas, lisadas com solução aquosa contendo 0.05% SDS e diluições do lisado foram plaqueadas em Sabouraud Agar a 30 °C por 2 dias. Os gráficos representam a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU/mL). * $P < 0.05$.

4. DISCUSSÃO

A resposta imune inata a infecções fúngicas vem sendo amplamente estudada. No entanto, vários aspectos referentes a este assunto necessitam de estudos complementares, principalmente aqueles que abordam a função dos inflamassomas em doenças fúngicas. Esse campo de estudo é bastante recente e os primeiros trabalhos demonstrando um papel para os inflamassomas em infecções fúngicas foram publicados em 2009 (Gross et al 2009, Hise et al 2009). Mesmo assim, os estudos acerca desse tema em comparação com outros microrganismos, como bactérias e vírus, parecem ser negligenciados. Tendo em vista este cenário, a proposta deste trabalho foi investigar os mecanismos de ativação do inflamassoma induzido pela infecção por *Cryptococcus neoformans*, e avaliar se a presença da cápsula deste fungo desempenha algum papel diferencial na ativação desse complexo.

Primeiramente, foi verificado se *C. neoformans* era capaz de induzir a secreção de IL-1 β em um modelo de infecção *in vitro* em macrófagos derivados de medula óssea (BMM). Como demonstrado em estudos anteriores, GXM é um polissacarídeo que compõe cerca de 90% da cápsula de *C. neoformans* e é reconhecido por TLR4 (Shoham et al 2001), o que em teoria levaria à transcrição da citocina pró-inflamatória pró-IL-1 β . Portanto, foi hipotetizado que apenas a infecção por *C. neoformans* seria capaz de induzir a maturação e secreção de IL-1 β em BMM. No entanto, foi observado que apenas em BMM primados com LPS, um agonista de TLR4, e infectados ocorria a secreção de IL-1 β . Logo, sugere-se que apenas a infecção por *C.*

neoformans não é suficiente para induzir os dois sinais necessários para a maturação de IL-1 β via a ativação do inflamassoma. Esse fenômeno é semelhante ao observado em alguns modelos de infecção por *C. albicans*, onde a sensibilização com LPS também é necessária para eficiente secreção de IL-1 β por BMM (Gross et al 2009).

A cápsula de *C. neoformans* reveste a parede celular desse fungo, a qual possui diversas moléculas que interagem com receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) em células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas (Zaragoza et al 2009). Tendo em vista esse ponto, foi feita uma infecção em BMM com *C. neoformans* inativado pelo calor. Mesmo assim, apenas as leveduras viáveis foram capazes de induzir a secreção de IL-1 β em BMM. Este resultado é semelhante aos obtidos em infecções *in vitro* de macrófagos pelos fungos *C. albicans* e *A. fumigatus* (Gross et al 2009, Said-Sadier et al 2010). Sabe-se que alguns inflamassomas são ativados frente a perturbações citosólicas (Jin & Flavell 2010). Uma possível explicação para a necessidade da viabilidade fúngica para a ativação do inflamassoma poderia, talvez, ser alguma relação com essas perturbações detectadas pelas células. Um importante receptor que participa no reconhecimento de β -glicana presente nessa parede celular é a dectina-1. Sabe-se que dectina-1 é capaz de cooperar com outros PRRs para um reconhecimento eficiente e indução da produção de citocinas frente a infecção por alguns patógenos. No entanto, esse papel desempenhado por dectina-1 não é abrangente para todas as células (Reid et al 2009). Foi observado que apenas a sinalização por dectina-1 é capaz de promover a produção de citocinas em células dendríticas, mas não em macrófagos, que

depende da cooperação entre dectina-1 e outros receptores (Goodridge et al 2009). Sabe-se, também, que macrófagos derivados de medula expressam menos dectina-1 do que células dendríticas derivadas de medula (Lin et al 2010), o que poderia explicar a necessidade de um sinal primário para a eficiente produção de IL-1 β no modelo de infecção utilizado nesse trabalho.

Referente à importância da cápsula de *C. neoformans* como um fator de virulência e estabelecimento da infecção, foi investigado o papel deste componente do fungo quanto a capacidade de ativação do inflamassoma em distintos tipos celulares. Através da comparação da infecção induzida pelo fungo selvagem (B3501) ou um mutante isogênico acapsular (CAP67), foi observado que o fungo encapsulado induz uma menor secreção de IL-1 β do que seu mutante acapsular. Esse fenômeno foi observado em macrófagos peritoneais (PM), BMM e em monócitos humanos (THP-1). É possível que a ausência de cápsula possibilite a interação dos componentes de parede celular com diversos PRRs das células, potencializando a sinalização e aumentando os níveis de mediadores inflamatórios secretados.

A ativação do inflamassoma, que culmina na ativação de caspase-1 e posterior processamento de IL-1 β é uma etapa chave nesse processo (Schroder & Tschopp 2010). Tendo em vista o mecanismo mediado por caspase-1, foi investigado se havia alguma alteração nesse processo durante a infecção induzida por B3501 ou CAP67. Surpreendentemente, em BMM infectados com B3501 não foi observada a ativação de caspase-1 intracelular e nem mesmo a secreção da subunidade p20. No entanto, altos níveis de caspase-1 intracelular e secretada foram detectados em BMM infectados com CAP67, sugerindo que o fungo encapsulado interfere ou possui um papel

modulador em um processo chave que leva à maturação e secreção de IL-1 β , evitando o seu reconhecimento pelo hospedeiro. A descoberta de outras proteases que também participam no processamento de IL-1 β que não caspase-1, como caspase-8 e caspase-11 pode ser uma explicação para os níveis detectáveis de IL-1 β em culturas de infecção com o fungo encapsulado (Dupaul-Chicoine & Saleh 2012, Kayagaki et al 2011), no entanto, essas outras vias de ativação não foram investigadas durante este trabalho.

Até o presente momento, diversos receptores da família dos NLRs com atividades características de inflamassomas foram descritos (Lamkanfi & Dixit 2012). Baseado nisso, foi investigado qual o possível receptor envolvido na maturação e secreção de IL-1 β induzida por *C. neoformans* em BMM. Através da utilização de camundongos *knockouts* para as proteínas NLRP3, ASC, caspase-1 e NLRC4, foi identificado que o eixo NLRP3-ASC-caspase-1, mas não NLRC4, era o responsável por induzir a secreção de IL-1 β no modelo experimental desse estudo. Este resultado não foi surpreendente e corrobora com os dados da literatura até então. Ao que parece, o inflamassoma NLRP3 é um receptor universal responsável por ser ativado frente a infecções fúngicas (Gross et al 2009, Hise et al 2009, Joly et al 2009, Said-Sadier et al 2010). No entanto, um papel protetor foi descrito para o receptor NLRC4 em um modelo de candidíase oral (Tomalka et al 2011).

Os fatores que levam a ativação do inflamassoma NLRP3 são controversos e ainda necessitam de estudos até serem elucidados. No entanto, há três principais teorias acerca do que possa levar a uma ativação indireta de NLRP3, (1) o efluxo de potássio, (2) geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e (3) liberação de cathepsina B proveniente do dano

lisossomal (Jin & Flavell 2010, Rathinam et al 2012a). Portanto, após identificar NLRP3 como o inflamassoma responsável por reconhecer *C. neoformans*, foi investigado o papel de catepsina B na produção de IL-1 β induzida por este fungo em BMM. Através da inibição dessa via, foi observado que há uma participação fundamental de catepsina B, pois sua inibição diminuiu drasticamente a produção de IL-1 β . O papel desse processo se mostrou específico para a produção de IL-1 β , pois os níveis de TNF- α permaneceram inalterados quando houve a inibição da mesma. Por isso, é proposta uma ativação indireta mediada pelos mecanismos citados nesse estudo. A busca pelo ligante de NLRP3 que leve a sua ativação é um alvo atrativo para os pesquisadores, e progressos tem sido feitos no que diz questão a esse assunto. Foi demonstrado que a proteína que se liga a guanilato 5 (GBP5) promove a oligomerização de NLRP3 frente a infecções bacterianas e agonistas solúveis, mas não cristalinos (Shenoy et al 2012). Recentemente, viu-se que a fosforilação de NLRC4 é fundamental no processo de reconhecimento de componentes bacterianos e sua posterior ativação (Qu et al 2012), e que a proteína quinase PKR desempenha um papel crucial, que envolve a interação física com diversos inflamassomas conhecidos, dentre eles: NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2 (Lu et al 2012, Stunden & Latz 2012). Também foi atribuída uma função ao receptor de cálcio na regulação da ativação de NLRP3 (Lee et al 2012). Uma área nova e bastante promissora que vem surgindo atualmente é a do estudo de infecções fúngicas e a regulação de microRNAs (miRNAs). A regulação de alguns miRNAs em macrófagos foi demonstrada em modelos de infecção por *C. albicans* (Monk et al 2010). E mais recentemente, observou-se que o miR-

223 é responsável por regular negativamente NLRP3 (Bauernfeind et al 2012, Haneklaus et al 2012).

Visto a importância dos CLRs no reconhecimento fúngico, foi avaliado o papel da proteína quinase Syk, responsável por participar da sinalização de diversos CLRs, incluindo dectina-1, dectina-2 e mincle (Kerrigan & Brown 2011). Após inibir Syk e analisar a produção de IL-1 β em células infectadas, foi observado uma drástica diminuição desta citocina no sobrenadante da cultura, sugerindo que Syk possui um papel crucial para a produção de IL-1 β frente a infecção induzida por *C. neoformans*. Este é um fato interessante, pois é descrito que Syk pode cooperar com NLRP3 para o eficiente processamento e secreção de IL-1 β (Poeck & Ruland 2010a, Poeck & Ruland 2010b). Recentemente o receptor dectina-1 foi associado com a indução de um inflamassoma não canônico que ativa caspase-8 para o processamento de IL-1 β frente a infecções causadas pelo fungos *C. albicans* e *A. fumigatus*, e a quinase Syk mostrou desempenhar um papel fundamental nesse processo através da ativação do complexo CARD9-Bcl-10-MALT1 (Gringhuis et al 2012). O papel de caspase-8 não foi avaliado nesse estudo, o que seria algo interessante de ser investigado, visto que a ativação do inflamassoma mediada por infecções fúngicas mostrou-se bastante conservada nos modelos utilizados até o presente momento.

A participação dos componentes dos inflamassomas no controle de infecções fúngicas foi demonstrada apenas em infecções sistêmicas causadas por *C. albicans* (Gross et al 2009, Hise et al 2009). Por isso, foi decidido investigar a possível contribuição dos componentes do inflamassoma na fagocitose e atividade antifúngica de macrófagos. Para isso,

BMM selvagens ou deficientes para as proteínas ASC, caspase-1 e NLRC4 foram infectados com *C. neoformans* e a fagocitose analisada. Não foi observada nenhuma diferença no índice de fagocitose entre as células selvagens ou *knockouts*. Foi avaliada também a atividade antifúngica desses macrófagos infectados, e observou-se que mesmo na ausência dos componentes do inflamassoma a atividade antifúngica se manteve similar entre BMM selvagens ou deficientes para as diferentes proteínas do complexo. Embora os estudos realizados nesse trabalho serem *in vitro*, é interessante avaliar o papel dessas diferentes moléculas *in vivo*, o que não foi possível neste caso.

Pelo fato dos componentes do inflamassoma não demonstrarem um papel no controle da infecção *in vitro*, investigou-se se a sinalização por IL-1 β teria alguma influência nesse processo. Observou-se que o tratamento de células infectadas com IL-1 β recombinante em diferentes concentrações não alterou a atividade antifúngica desses macrófagos, demonstrando que apenas a sinalização via o receptor IL-1R não foi capaz de aumentar a morte de leveduras intracelulares. De fato, a cooperação entre vários receptores foi associada a uma atividade antifúngica eficiente em um modelo de infecção induzido por *C. albicans* (Netea et al 2006). Após ver que nem os componentes do inflamassoma e nem a sinalização por IL-1 β desempenhavam um papel crucial para a atividade antifúngica de macrófagos, foi investigado o papel de IL-1 β diretamente sobre as leveduras. Para isso, as células foram tratadas com IL-1 β recombinante em diferentes concentrações e ao mesmo tempo infectadas. De forma bastante interessante, observou-se que a taxa de infecção foi reduzida de forma

drástica e dose-dependente, sugerindo que IL-1 β possua um papel responsável por restringir a taxa de infecção de macrófagos por leveduras. Sabe-se que a sinalização por IL-1 β leva a produção de uma série de mediadores inflamatórios, como IL-6, TNF- α e IL-17 (Lukens et al 2012, Sutton et al 2009), o que poderia contribuir para a restrição de leveduras extracelulares, visto que esses mediadores inflamatórios possuem um papel protetor contra infecções fúngicas em algumas situações (Mills et al 2012). De forma interessante, foi observado em estudos anteriores que IL-1 β exógena participa na restrição de algumas espécies de *Mycobacterium* (Chen et al 2012, Mayer-Barber et al 2010, Wieland et al 2006). Durante a infecção por *C. neoformans*, essas leveduras são capazes de escaparem dos macrófagos através de um processo denominado exocitose não-lítica (Alvarez & Casadevall 2006, Nicola et al 2011), evitando, desta forma, a causa de inflamação local, possibilitando com que essas leveduras não sejam detectadas por células do sistema imune e possam infectar células vizinhas. Talvez a IL-1 β possa contribuir na restrição dessas leveduras através da ativação dessas células, evitando a infecção de células vizinhas.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos durante este trabalho, foi demonstrado pela primeira vez que após a infecção *C. neoformans* induz a ativação do inflamassoma NLRP3 através de mecanismos indiretos, como liberação de catepsina B frente ao dano lisossomal. Após a ativação de NLRP3, caspase-1 é clivada e participa no processamento de IL-1 β . O processo de maturação de IL-1 β é coordenado em cooperação com a proteína quinase Syk. A IL-1 β secretada desempenha, então, um papel crucial que leva à redução da taxa de infecção por mecanismos não elucidados nesse trabalho (Figura 11). Finalmente, este estudo sugere que leveduras encapsuladas de *C. neoformans* ativam o inflamassoma de forma diferencial quando comparado as leveduras acapsulares. A execução deste projeto permitiu o preenchimento de lacunas existentes no entendimento da resposta imune inata a infecção por *C. neoformans*, visando a elucidação de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ativação dos macrófagos infectados por este fungo.

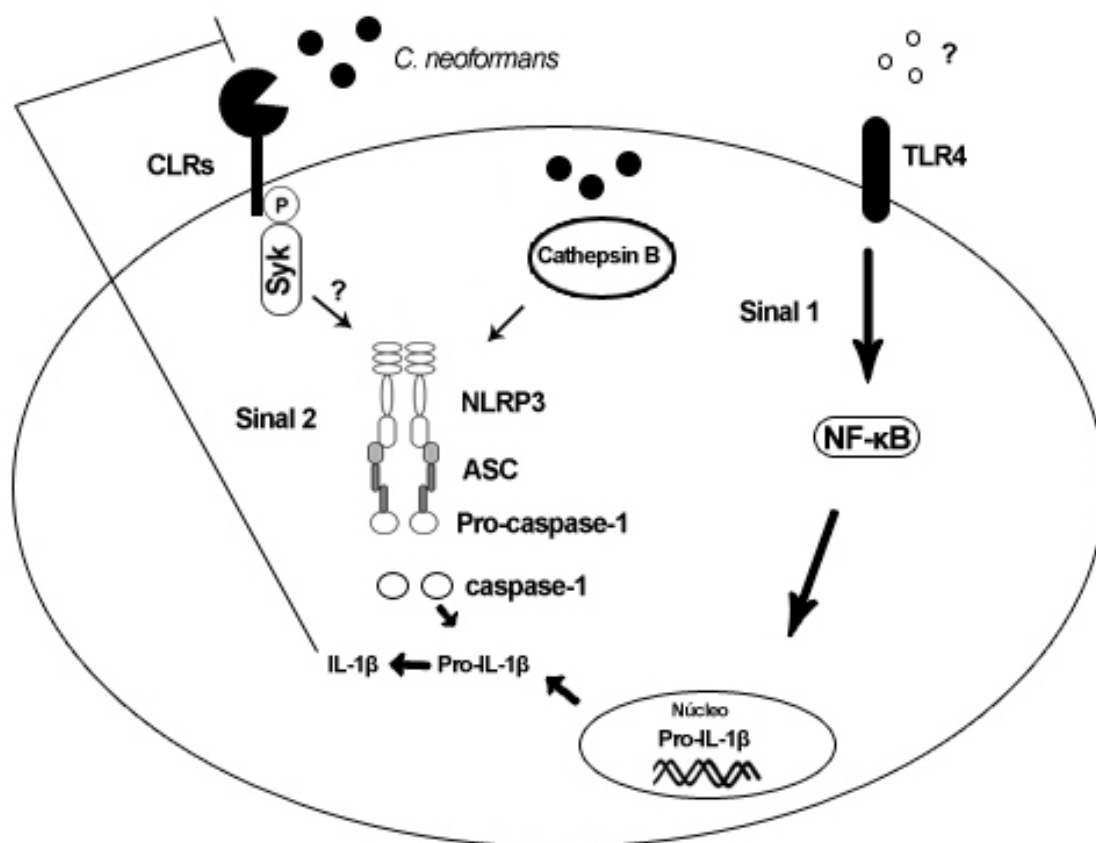


Figura 11. Modelo proposto da ativação do inflamassoma por *C. neoformans*. Após a internalização de leveduras de *C. neoformans* por macrófagos, ocorre a ativação da proteína quinase Syk e a liberação de catepsina B, proveniente do dano lisossomal. Essas perturbações na célula acabam por ativar a oligomerização do complexo NLRP3, levando à ativação de caspase-1, processamento, maturação e secreção de IL-1 β . A forma madura de IL-1 β secretada participa na restrição da taxa de infecção por mecanismos ainda não descritos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, et al. 2009. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30: 556-65
- Alvarez M, Casadevall A. 2006. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 16: 2161-5
- Anand PK, Malireddi RK, Lukens JR, Vogel P, Bertin J, et al. 2012. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* 488: 389-93
- Araujo Gde S, Fonseca FL, Pontes B, Torres A, Cordero RJ, et al. 2012. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus spp.* manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. *PLoS One* 7: e29561
- Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, et al. 2011. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* 68: 765-83
- Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. 2012. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol* 189: 4175-81

- Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, et al. 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 172: 3059-69
- Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB. 2006. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immun* 74: 6528-39
- Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Lesiak-Markowicz I, Hildering KS, et al. 2011. Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against *Candida spp.* requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling. *J Immunol* 186: 3104-12
- Boyden ED, Dietrich WF. 2006. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38: 240-4
- Brown GD. 2011. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 29: 1-21
- Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. 2008. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 1-7
- Carvalho A, Cunha C, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Denning DW, Romani L. 2010. Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases. *Int J Infect Dis* 14: e460-8

- Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, et al. 1998. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1437-46
- Chakrabarti A. 2005. Microbiology of systemic fungal infections. *J Postgrad Med* 51 Suppl 1: S16-20
- Chang YC, Kwon-Chung KJ. 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* 14: 4912-9
- Chen CC, Tsai SH, Lu CC, Hu ST, Wu TS, et al. 2012. Activation of an NLRP3 inflammasome restricts *Mycobacterium kansasii* infection. *PLoS One* 7: e36292
- Chen GY, Liu M, Wang F, Bertin J, Nunez G. 2011. A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J Immunol* 186: 7187-94
- Chrisman CJ, Alvarez M, Casadevall A. 2010. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 76: 6056-62
- Dupaul-Chicoine J, Saleh M. 2012. A new path to IL-1beta production controlled by caspase-8. *Nat Immunol* 13: 211-2
- Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, et al. 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145: 745-57

- Faguy DM. 2011. Fungal pathogens: an overview. *Radiol Technol* 82: 321-40
- Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147: 2355-65
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458: 509-13
- Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. 2012. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 13: 325-32
- Frases S, Pontes B, Nimrichter L, Rodrigues ML, Viana NB, Casadevall A. 2009a. The elastic properties of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Biophys J* 97: 937-45
- Frases S, Pontes B, Nimrichter L, Viana NB, Rodrigues ML, Casadevall A. 2009b. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1228-33
- Goodridge HS, Shimada T, Wolf AJ, Hsu YM, Becker CA, et al. 2009. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 182: 1146-54
- Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. 2007. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 26: 605-16

Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, van der Vlist M, et al. 2012.

Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome.

Nat Immunol 13: 246-54

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, et al. 2009.

Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459: 433-6

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, et al. 2008. The

NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* 9: 857-65

Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey AA, Pich D, et al.

2012. Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. *J Immunol* 189: 3795-

9

Hardison SE, Brown GD. 2012. C-type lectin receptors orchestrate antifungal

immunity. *Nat Immunol* 13: 817-22

Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, et al. 2009. An essential

role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 5: 487-97

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. 1996. Virulence factors of medically

important fungi. *Clin Microbiol Rev* 9: 469-88

- Jin C, Flavell RA. 2010. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol* 30: 628-31
- Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS. 2009. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* 183: 3578-81
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 56: 211-24
- Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, et al. 2011. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479: 117-21
- Kerrigan AM, Brown GD. 2011. Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol* 32: 151-6
- Kmetzsch L, Joffe LS, Staats CC, de Oliveira DL, Fonseca FL, et al. 2011. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Mol Microbiol* 81: 206-18
- Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. 2009. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol* 11: 370-80

- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, et al. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 9: 193-203
- Lamkanfi M, Dixit VM. 2012. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 137-61
- Lee GS, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, et al. 2012. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature*
- Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. 1999. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* 67: 885-90
- Levitz SM, Tabuni A. 1991. Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. *J Clin Invest* 87: 528-35
- Lin JS, Huang JH, Hung LY, Wu SY, Wu-Hsieh BA. 2010. Distinct roles of complement receptor 3, Dectin-1, and sialic acids in murine macrophage interaction with *Histoplasma* yeast. *J Leukoc Biol* 88: 95-106
- Lin X. 2009. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9: 401-16
- Lin X, Heitman J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60: 69-105

- Lin X, Hull CM, Heitman J. 2005. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature* 434: 1017-21
- Litvintseva AP, Marra RE, Nielsen K, Heitman J, Vilgalys R, Mitchell TG. 2003. Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. *Eukaryot Cell* 2: 1162-8
- Liu OW, Chun CD, Chow ED, Chen C, Madhani HD, Noble SM. 2008. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* 135: 174-88
- Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, et al. 2012. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 488: 670-4
- Lukens JR, Gross JM, Kanneganti TD. 2012. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol* 3: 315
- Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. 2006. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 16: 2156-60
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, et al. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-32
- Marim FM, Silveira TN, Lima DS, Jr., Zamboni DS. 2010. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One* 5: e15263

- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-41
- Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, et al. 2010. Caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol* 184: 3326-30
- McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. 2006. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun* 74: 1500-4
- McFadden DC, De Jesus M, Casadevall A. 2006. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem* 281: 1868-75
- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, et al. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* 7: 569-75
- Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, et al. 2010. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3076-80
- Mills KH, Dungan LS, Jones SA, Harris J. 2012. The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *J Leukoc Biol*

- Mitchell TG, Perfect JR. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8: 515-48
- Monari C, Pericolini E, Bistoni G, Casadevall A, Kozel TR, Vecchiarelli A. 2005. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *J Immunol* 174: 3461-8
- Monk CE, Hutvagner G, Arthur JS. 2010. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. *PLoS One* 5: e13669
- Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, et al. 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116: 1642-50
- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, et al. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3712-8
- Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski Lda S, Casadevall A. 2011. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. *MBio* 2
- Osterholzer JJ, Curtis JL, Polak T, Ames T, Chen GH, et al. 2008. CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of

- bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 181: 610-20
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525-30
- Pericolini E, Cenci E, Monari C, De Jesus M, Bistoni F, et al. 2006. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. *Cell Microbiol* 8: 267-75
- Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. 2005. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun* 73: 820-7
- Poeck H, Ruland J. 2010a. ITAM receptor signaling and the NLRP3 inflammasome in antifungal immunity. *J Clin Immunol* 30: 496-501
- Poeck H, Ruland J. 2010b. SYK kinase signaling and the NLRP3 inflammasome in antifungal immunity. *J Mol Med (Berl)* 88: 745-52
- Qin QM, Luo J, Lin X, Pei J, Li L, et al. 2011. Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 7: e1002078
- Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, Newton K, Gilmour LL, et al. 2012. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature* 490: 539-42

- Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. 2012a. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 13: 333-2
- Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, et al. 2012b. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 150: 606-19
- Reid DM, Gow NA, Brown GD. 2009. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* 21: 30-7
- Ritter M, Gross O, Kays S, Ruland J, Nimmerjahn F, et al. 2010. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20459-64
- Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, et al. 2009. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 206: 2037-51
- Romani L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11: 275-88
- Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. 2010. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One* 5: e10008
- Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, et al. 2006. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 281: 38854-66
- Schroder K, Tschopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140: 821-32

- Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, Kassa H, Booth CJ, et al. 2012. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 336: 481-5
- Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. 2001. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 166: 4620-6
- Sorrell TC, Ellis DH. 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 14: 42-3
- Stunden HJ, Latz E. 2012. PKR stirs up inflammasomes. *Cell Res*
- Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31: 331-41
- Szymczak WA, Deepe GS, Jr. 2009. The CCL7-CCL2-CCR2 axis regulates IL-4 production in lungs and fungal immunity. *J Immunol* 183: 1964-74
- Taborda CP, Casadevall A. 2002. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity* 16: 791-802

- Tian X, Pascal G, Monget P. 2009. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* 9: 202
- Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, et al. 2011. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 7: e1002379
- Villena SN, Pinheiro RO, Pinheiro CS, Nunes MP, Takiya CM, et al. 2008. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell Microbiol* 10: 1274-85
- Voelz K, May RC. 2010. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell* 9: 835-46
- Warren SE, Armstrong A, Hamilton MK, Mao DP, Leaf IA, et al. 2010. Cutting edge: Cytosolic bacterial DNA activates the inflammasome via Aim2. *J Immunol* 185: 818-21
- Wieland CW, Florquin S, Pater JM, Weijer S, van der Poll T. 2006. Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract. *Microbes Infect* 8: 2409-13
- Wozniak KL, Vyas JM, Levitz SM. 2006. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infect Immun* 74: 3817-24

Xu S, Huo J, Lee KG, Kurosaki T, Lam KP. 2009. Phospholipase Cgamma2 is critical for Dectin-1-mediated Ca²⁺ flux and cytokine production in dendritic cells. *J Biol Chem* 284: 7038-46

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133-216

Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A. 2003. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol* 33: 1957-67